

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie
und Pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz)
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

BESTIMMUNGSMETHODEN UND VORKOMMEN VON
HISTAMIN IM GEFÄSSSYSTEM UND
IN VERSCHIEDENEN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN
DES HUNDES

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

JÜRGEN ECKART MICHAEL RÜCKERT

aus Langenbielau

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie
und Pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz)
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

BESTIMMUNGSMETHODEN UND VORKOMMEN VON
HISTAMIN IM GEFÄSSSYSTEM UND
IN VERSCHIEDENEN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN
DES HUNDES

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

JÜRGEN ECKART MICHAEL RÜCKERT

aus Langenbielau

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 19. August 1977
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. med. W. Lorenz

Correferent: Prof. Dr. med. dent. H. Schnell

Meinen Eltern und Elisabeth in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Gegenwärtige Probleme der Histaminbestimmung.	1
1.2. Bestimmungsmethoden für Histamin beim Hund.	5
1.3. Vorkommen von Histamin in Blut- gefäßen, Blut und anderen Körper- säften.	9
1.3.1. Histamin in Blutgefäßen.	9
1.3.2. Histamin im Vollblut.	12
1.3.3. Histamin in Galle und Pankreas- saft.	13
2. <u>Ziel der Arbeit</u>	16
3. <u>Material und Methodik</u>	17
3.1. <u>Material</u>	17
3.1.1. Die Gewinnung von Blutgefäßen.	18
3.1.2. Die Gewinnung von Vollblut, Galle und Pankreassekret.	18

3.2.	Histaminbestimmungsmethoden	19
3.2.1.	Kationenaustauschermethode (Dowex - Methode)	19
3.2.2.	Butanol - Extraktions - Methode	19
3.2.3.	Kombinierte Methode	20
3.3.	Statistische Berechnung	20
4.	<u>Ergebnisse</u>	21
4.1.	Histamin in Blutgefäßen	21
4.2.	) Histaminbestimmungsmethoden im Vollblut	27
4.3.	Bestimmungsmethoden für Histamin in Galle und Pankreassaft : Aus- schluß der Anwesenheit von Histamin	34
5.	<u>Diskussion</u>	39
5.1.	Histamin in Gefäßwänden	39
5.2.	Histaminbestimmung in Geweben und Körperflüssigkeiten	40
6.	<u>Zusammenfassung</u>	43
7.	<u>Literatur</u>	44

1. Einleitung

1.1. Gegenwärtige Probleme der Histaminbestimmung

Es gibt eigentlich heute keine Methode für die Histaminbestimmung, die unter bestimmten Bedingungen nicht mehr ohne Probleme ist. Vor allen Dingen aber sind es einige chemische Verfahren, wie die fluorometrische Methode nach Shore et al. (1959) und die biologische Bestimmung über das isolierte Meerschweinchenileum nach Barsoum und Gaddum (1935), die in früheren wissenschaftlichen Untersuchungen oft verwendet wurden, die aber keine genügende Spezifität für Körperflüssigkeiten und Gewebe mit extrem niedrigen Histamingehalt besitzen, wie Plasma und Gehirn aufwiesen (Carlini und Green, 1963; Michaelson und Coffmann, 1967; Lorenz et al. 1970; Lorenz et al. 1971). Deshalb ist eine erneute Prüfung des Histamingehalts zahlreicher Gewebe mit Hilfe von spezifischeren Methoden zu fordern. Die Spezifität dieser Verfahren wurde durch verschiedene chemische und biologische Kriterien gesichert, wie Spektren, Abbau durch spezifische Enzyme und pH_2 -Werte am isolierten Meerschweinchendarm (Lorenz, Barth und Werle, 1970; Lorenz, Benesch et al. 1970; Lorenz et al 1971).

Gerade diese letzteren Untersuchungen zeigten aber auch, daß man die alten Methoden nicht vollkommen verdammen darf. Der direkte Vergleich der Histaminwerte, der mit dem Bioassay, der Butanolextraktionsmethode (Shore et al. 1959), der Dowex-Methode und der kombinierten Methode (Lorenz et al. 1970; Lorenz et al. 1971; Lorenz et al. 1973) durchgeführt wurde, hat dies gezeigt. Auch der indirekte Vergleich der Histaminwerte

im Gewebe, der durch die Zusammenstellung von Histamingehalten aus der Weltliteratur erzielt wurde (Lorenz und Werle 1974) zeigte eine gute Übereinstimmung in so vielen Fällen, daß allgemeine Zweifel an der Zuverlässigkeit des Bioassays und an den fluorometrischen Methoden zur Histaminbestimmung sich nicht länger halten konnten. Nur im Falle von Geweben mit **extrem niedrigen** Histaminkonzentrationen, wie in bestimmten Nervengeweben (Carlini und Green, 1963; Kremzner und Pfeiffer, 1966) und Körperflüssigkeiten, sollte man prinzipiell vorsichtig mit Histaminbestimmungen sein. Das beste Isolierungsverfahren, das die größtmögliche Spezifität ergibt, muß in jedem einzelnen Fall überprüft und ermittelt werden. (Lorenz et al. 1970; Lorenz et al. 1971; Lorenz et al. 1973; Lorenz et al. 1972). Hierfür gibt es spezifische und relativ unspezifische Kriterien (Abb. 1 und 2), wobei mehrere unspezifische Kriterien auch bereits einen hohen Aussagewert besitzen.

-
1. Abbau durch gereinigte Diaminoxydase (verschiedene Herkunft, identische Reaktionsgeschwindigkeit mit authentischem Histamin).
 2. Inaktivierung durch gereinigte Histaminmethyltransferase (identische Reaktionsgeschwindigkeit). Verschwinden der Fluoreszenz und Bildung von ^{14}C - T - Methylhistamin.
 3. Bioassay am Meerschweinchenileum oder Katzenblutdruck unter Verwendung niedriger Dosen von spezifischen H_1 - Receptorantagonisten (pH_2 - Werte).
 4. Dünnschichtchromatographie
 5. Elementaranalyse
 6. Schmelzpunktbestimmung
 7. Gaschromatographie - Massenspektrometrie
-

Abb. 1

Spezifische Kriterien zum Nachweis der Spezifität der Histaminbestimmung in Geweben und Körperflüssigkeiten.

-
1. Fluoreszenz - Spektren
 2. Zeitabhängiges Entstehen und Verschwinden der Fluoreszenz bei 0°C und 21°C .
 3. Unterdrückung der Fluoreszenz in Gegenwart von 1 M Formaldehyd.
 4. Verschwinden der Fluoreszenz nach zwei Stunden Kochzeit.
 5. Auffinden identischer Mengen nach verschiedenen Isolierungsverfahren (auf Ausbeute korrigiert).
-

Abb. 2

Relativ unspezifische Kriterien zur Identifizierung von Histamin in Geweben und Körperflüssigkeiten.

1.2. Bestimmungsmethoden für Histamin beim Hund.

Histamin läßt sich in Hundegeweben sowohl mit der Dowexmethode wie auch mit der Extraktionsmethode nach Shore et al. (1959) spezifisch bestimmen. Der Vergleich dieser beiden fluorometrischen Methoden zeigte ein hohes Maß an Übereinstimmung (Abb. 3). Die aus Hundegeweben isolierte Substanz war mit authentischen Histamin als identisch anzusehen, welches die hohe Spezifität der Ionenaustauschermethode bei Hundegeweben auch im Bioassay zeigte (Lorenz et al. 1970; Lorenz et al. 1971). Auch bei drei unterschiedlichen Reinigungsprozessen, welche für die fluorometrische Bestimmung des Histamins bei Schwein und Meerschweinchen angewandt wurden (Butanol Extraktion, Ionenaustauschchromatographie und eine Kombination beider Methoden), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Histamingehalten dieser Gewebe. (Lorenz et al. 1971).

In Körperflüssigkeiten des Hundes war die Bestimmung von Histamin dagegen problematisch. So reichte beim Vergleich dreier Isolierungsmethoden die Dowex-Methode für Plasma nicht mehr für eine spezifische Messung aus, für Hundevollblut schien sie geeignet zu sein. (Abb. 4)

Für Plasma (Lorenz et al. 1974 a) und Speichel (Lorenz et al. 1973 a) war aber nur die kombinierte Methode aus Ionenaustauschchromatographie und Butanol-extraktion spezifisch. Die Substanz im Speichel wurde mit Hilfe des Fluoreszenzspektrums, durch Abbau mit 60-fach gereinigter Diaminoxidase aus Schweineleiere und mit 48-fach gereinigter Histaminmethyltransferase aus Schweineantrum sowie durch Dünnschichtchromatographie als Histamin identifiziert.

Histaminkonzentration in $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht

Gewebe	Butanol- extraktion	Dowex 50
Niere	2,3	2,4
Ureter	30,8	32,5
Harnblase	7,1	6,2
Muskeln		
Masseter	1,3	1,1
Sternomastoideus	1,7	1,7
Larynx	2,1	2,0
Triceps brachii	2,1	1,7
Extensor digitorum	1,4	4,3
Deltoideus	1,8	1,6
Intercostales	3,0	2,7
Rectus abdominis	1,9	1,5
Externus obliquus	3,4	3,0
Psoas	1,7	1,7
Autochthone Rückenmuskeln	1,7	2,3
Glutaeus maximus	2,4	2,3
Biceps femoris	2,8	2,3
Semitendinosus	1,9	1,8
Gastrocnemius	3,3	2,9
Diaphragma	7,0	6,5

Abb. 3

Vergleich der Resultate der Butanol-extraktionsmethode nach Shore et al. (1959) und der Dowex-Methode nach Lorenz et al. (1970) bei Hundegeweben. Es wurde jeweils pro Hund die ganze Serie an Geweben entnommen. 2 Tiere wurden verglichen. (Nach Lorenz et al. 1973)

Versuchstier Nr.	Reinigungsprozedur durch		
	Butanol- extraktion	Dowex 50	Dowex 50 + Butanol- extraktion
	(I)	(II)	(III)
1	30	20	24
2	39	42	38
3	44	29	25
4	45	30	32
5	50	20	25
6	51	51	44
7	62	28	16
Median	45	29	25
(unteres und oberes Quartil)	(39-51)	(20-42)	(24-38)

Abb. 4

Vergleich der Ergebnisse von drei unterschiedlichen Reinigungsprozessen zur Histaminbestimmung im Hundevollblut.

Das Blut jedes der Tiere wurde zum Vergleich der 3 Methoden verwendet. Für die Berechnung des Median und des unteren und oberen Quartils siehe Snedecor und Cochran (1967) und Büttner et al. (1970). Statistische Signifikanz (Wilcoxon-Test) :

I / II $p < 0,05$; I / III $p < 0,01$, II / III nicht signifikant (Lorenz et al. 1974).

Durch die Butanolextraktionsmethode nach Shore et al. (1959) wurden Histaminwerte gewonnen, die durchschnittlich um 50 % höher lagen, als die, welche durch die kombinierte Methode erzielt wurden. Nach der Chromatographie an Dowex 50 wurden sogar noch höhere Werte als nach der Butanolextraktion beobachtet. Da bewiesen werden konnte, daß nach der kombinierten Methode nur Histamin fluorometrisch gemessen wurde, scheint diese Methode das bevorzugte Verfahren für die fluorometrische Bestimmung von Histamin im Hundespeichel zu sein.

1.3. Vorkommen von Histamin in Blutgefäßen, Blut und anderen Körpersäften

1.3.1. Histamin in Blutgefäßen.

Bei Rind und Meerschweinchen hat die Aorta ein erheblichen Histamingehalt (Abb. 5), bei Schwein und Affen ist er dagegen sehr gering. Auch die Vena cava inferior des Rindes ist reich an Histamin. Nach Riley und West (1953) entsprechen diese Befunde der unterschiedlichen Mastzellichte in der Gefäßwand. In der Tat wurden von Jorpes et al. (1937) und Jopes (1938) zahlreiche Mastzellen in der Vena cava und in der Aorta des Rindes gefunden, während die des Schweines praktisch keine Mastzellen enthielt. Auch beim Meerschweinchen wurden in den großen arteriellen Gefäßen zahlreiche Mastzellen nachgewiesen (Mendes Fagundes 1949).

Die Mastzellichte spielt im Rahmen der Atheroskleroseforschung eine Rolle. So fand man bei Patienten mit weniger Mastzellen in der Gefäßwand mehr atherosklerotische Läsionen und mehr Herzinfarkte (Fernex 1968). Die Untersuchung des Histaminstoffwechsels in den Gefäßen scheint deshalb von klinischer Bedeutung zu sein.

Gefäß	Spezies	Histamingehalt in $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht	Literatur
Aorta	Mensch	4,2	Stone et al. 1955
	Schwein	0,7	Riley und West 1953
		1,0	West 1959
	Rind	10,0	Riley und West 1953, West 1959
		17,0	Mongar und Schild 1952
	Meerschwein- chen	12,5	Boréus und Chakravarty 1960
		12,0	Chakravarty 1960
Vena cava inferior	Rind	20,0	Riley und West 1953, West 1959
Art. fem- oralis	Affe	1,4	Juhlin 1967
Vene	Affe	0	Juhlin 1967

Abb. 5

Histamingehalt von Blutgefäßen

Im anaphylaktischen Schock wird beim Meerschweinchen verhältnismäßig viel Histamin aus der Aorta freigesetzt (Mongar und Schild 1952, Chakravarty 1960, Brocklehurst 1960, Vurek et al. 1967). Auch Verbindung 48/80 und D - Tubocurarin sind starke Histaminliberatoren in der Meerschweinenaorta (Mongar und Schild 1952).

Außer in Mastzellen findet man Histamin vor allem in Muskelzellen der Arteriolen (Juhlin und Shelley 1966, Juhlin 1967, Weinshelbaum und Ferguson 1966). Auch in den Kapillarendothelien ist es nach Untersuchungen dieser Autoren nachweisbar. Von größter Bedeutung in der Endstrombahn dürfte aber das -wahrscheinlich in den Gefäßendothelien entsprechende- " induced histamine " sein (Schayer 1961, 1962), das die Mikrozirkulation reguliert. Dieses Histamin hat einen so schnellen Umsatz, daß es durch Bestimmung des Histamingehaltes im Gewebe oder Blut bisher nicht erfaßt werden konnte, sondern nur durch die Messung der induktiven Zunahme der Histidindecaboxylase-Aktivität.

1.3.2. Histamin im Vollblut

Für den Histamingehalt im Vollblut verschiedener Spezies liegen zahlreiche Untersuchungen vor, wobei uns hier vor allem die beim Hund interessieren. Die erste exakte Methode zur Bestimmung von Histamin im Blut von Mensch und Hund wurde von Barsoum und Gaddum (1935) mit dem isolierten Meerschweinchenileum als Testobjekt entwickelt. Code (1937) vereinfachte diese Methode, die seither eine der Standardbestimmungsmethoden für diese Körperflüssigkeit wurde. Dabei wurde der bis dahin exakteste chemische Nachweis von Histamin im Blut von Code und Ing (1937) durchgeführt, in dem Histamin mit pharmakologischen und chemischen Methoden (Schmelzpunktbestimmung von Histaminsalzen, Elementaranalyse) identifiziert wurde.

Über den Histamingehalt im Blut des Menschen liegt eine ausgezeichnete, sehr umfassende Übersicht von Lindell und Westling (1966) vor. Als Mittelwert ist danach ein Gehalt von 60 $\mu\text{g/ml}$ anzusehen. Signifikante Unterschiede zwischen Frauen und Männern besteht nicht.

Der Histamingehalt des Blutes verschiedener Säugetiere unterscheidet sich von dem des Menschen teilweise erheblich. Hund und Katze haben einen niedrigeren Histaminspiegel als der Mensch, Rind, Pferd und Ratte etwa denselben, während Meerschweinchen, Hamster, Schwein und vor allem das Kaninchen einen höheren Histamingehalt als der Mensch besitzen (Rocha e Silva, 1966).

Der Bluthistamingehalt des Kaninchens weicht von dem aller untersuchten Spezies ab. Es beträgt 10-20 $\mu\text{g/ml}$ Gesamtblut. Die Ursache liegt in dem hohen Histamingehalt der Thrombocyten. Aber auch das Schwein hat nach

Lorenz et al. (1971) einen sehr hohen Histamingehalt von etwa 2-3 $\mu\text{g/g}$. Die Ursache dieses hohen Wertes ist nicht bekannt. Im übrigen sei darauf verwiesen, daß das Schwein in den meisten Organen einen Histamingehalt aufweist, der beim Vergleich zu anderen Spezies jeweils zu dem höchsten zählt. Diese Tatsache ist tiermedizinisch von besonderer Bedeutung, da beim Schwein zahlreiche Erkrankungen unter dem Bilde von Allergosen verlaufen (Lorenz et al. 1971).

In Abb. 6 sind die Werte für Hundevollblut aus der Weltliteratur dargestellt. Sie zeigen eine erhebliche Schwankung zwischen 410 $\mu\text{g/ml}$ und 0 $\mu\text{g/ml}$. Die Ursachen hierfür dürften falsche Bestimmungen sein, wie wir weiter unten noch zeigen werden.

1.3.3. Histamin in Galle und Pankreassaft

In der Galle wurde Histamin bisher nur von Ungar und Pocouľ (1937) nachgewiesen, doch erscheint der Wert von 750 $\mu\text{g/ml}$, verglichen mit dem Histamingehalt anderer Körperflüssigkeiten, zu hoch. Nach Sekretinjektion kam es nach Brodie et al. (1966) zu einer Freisetzung von ^3H -Histamin in Galle und Pankreassaft der Katze, nachdem zuvor den Tieren ^3H -Histamin verabreicht worden war.

Im Pankreassaft konnte Histamin erstmals von Lorenz et al. (1968) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 zusammengestellt. Danach setzt der physiologische Pankreasstimulator Sekretin Histaminmengen frei, die denen von Pilocarpin in der Gl. *submaxillaris* des Hundes entsprechen. Wie wir später zeigen werden, enthalten nach Messung mit spezifischen Methoden weder Galle noch Pankreassaft meßbare Mengen Histamin (unter 100 pg = meßbare Menge!) Irrtümer in der Histaminbestimmung sind bis heute nicht ausgeschlossen, wenn nicht sorgfältig die gemessene Substanz identifiziert wird.

Art	Histamingehalt in $\mu\text{g/ml}$ Gesamtblut	Literatur
Hund	0,28 - 0,41	Kadykow und Federova 1956
	0,11 (0,05-0,18) ^a	Zeppa et al. 1961
	0,14 - 0,19	Hahn und Wellmann 1952
	0,04 - 0,09	Emmelin et al. 1941
	0,04 - 0,075	Barsoun und Gaddum 1935
	0,05 (0,03 - 0,08)	Anrep et al. 1939
	0,05	Shore et al. 1959
	0,04	Halpern et al. 1956
	0,03	Code und Mitchell 1957
	0,025 - 0,035	Minard 1941
	0,025 - 0,033	Anrep und Barsoun 1935
	0,019 - 0,037	Magazinović et al. 1966
	0,023 (0,02-0,04)	Behrmann et al. 1945
	0,0 - 0,1	Hinshaw et al. 1961
	0,016 (0,0-0,04)	Code 1939
	0,014	Thompson und Walton 1964
	0,0 - 0,02	Tinel et al. 1938
	0,009	Mundy et al. 1967
	0,0 - 0,018	Code und Jensen 1941
	0,0 - 0,016	Code, 1937

Abb. 6

Histamingehalt des venösen Gesamtblutes beim Hund.

Mittelwerte, Extremwerte in Klammern; Histamin
als freie Base angegeben.

Stimulans	Histamingehalt in ug/ml Pankreassaft
-----------	---

Sekretin	0,07 $\pm$ 0,01
Pancreozymin	0,05 $\pm$ 0,02
Pilocarpin	0,28 $\pm$ 0,16
Histamin	0,34 $\pm$ 0,20

Abb. 7

Histamingehalt des Pankreassaftes beim Hund nach
Stimulierung der Drüse mit Sekretin, Pancreozymin,
Pilocarpin und Histamin (Nach Lorenz et al. 1968).

Mittelwerte $\pm$ Standartabweichung.

2. Ziel der Arbeit

1. Es wurden im Gefäßsystem des Hundes systematisch die Histamingehalte bestimmt.
2. Im Vollblut des Hundes wurden die bisherigen Histaminbestimmungsmethoden überprüft.
3. Die Normalwerte für Hundevollblut wurden für zwei Kollektive aus Marburg und München festgelegt.
4. Für Galle und Pankreassaft wurde die Spezifität der bisherigen Histaminbestimmungsmethoden überprüft.

3. Material und Methodik

3.1. Material

Die Versuche mit Vollblut, Galle und Pankreassaft wurden an drei Bastardhunden, die Versuche mit Blutgefäßen an sechs Bastardhunden im Alter von 3-7 Jahren, mit einem Körpergewicht von 22-35 kg sowie beiderlei Geschlechts durchgeführt. Die Hunde wurden mit 20-30 mg/kg i.v. Pentobarbital narkotisiert, wodurch die Histaminfreisetzung durch verwendete Anästhetika und durch Stress während der Operationen als minimal betrachtet werden konnte. Die Proben von Vollblut, Pankreassaft und Galle wurden vorbereitet und gelagert nach Lorenz et al. (1972). Die Gewebeproben wurden mit 2 Teilen 0,4 M HClO₄ versetzt und maximal eine Woche in einer Gefriertruhe (- 21 °C) aufbewahrt, bevor ihr Histamingehalt bestimmt wurde.

Folgende Medikamente und Reagenzien wurden gebraucht: Pentobarbital Natrium (Abbott, Ingelheim), Histamin-dihydrochlorid purissimum (Fluka), Secretin (Boots Comp. Ltd. Nottingham, England).

Alle folgenden Lösungen für die Bestimmung der Histamingehalte wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

Zur Histaminbestimmung und Identifizierung wurden dieselben Reagenzien und dieselbe Anordnung benutzt, wie sie Lorenz et al. (1972, 1974a) beschrieben hat. Es wurde herausgefunden, daß alle Medikamente und Reagenzien frei von Stoffen waren, die mit o-Phthaldialdehyd reagierten oder die Histaminbestimmung beeinträchtigten.

3.1.1. Die Gewinnung von Blutgefäßen.

Die Blutgefäße wurden von Hunden entnommen, die über einen arteriellen Katheder entblutet waren. Dauer der Entblutung ca. 10 Minuten. Anschließend wurde durch einen Medianschnitt das Abdomen eröffnet und 30 Gewebeproben verschiedener Arterien und Venen (siehe unten), die etwa 1g wogen, entnommen und in 9 ml 0,4 N HClO_4 aufbewahrt und eingefroren.

3.1.2. Die Gewinnung von Vollblut, Galle und Pankreassekret.

Durch eine Medianschnitt wurde das Abdomen bei den narkotisierten Hunden eröffnet und nach der Methode von Lorenz et al. (1968) ein Polyäthylenkatheter in den Ductus Santonini geschoben, ein zweiter Katheder wurde in den Ductus Choledochus eingeführt, nachdem der Ductus Cysticus unterbunden war. Der so gewonnene Pankreassaft und die Galle wurden in Meßkolben abgeleitet. 3 Einheiten Secretin wurden alle 20 Minuten zur Stimulierung von Galle und Pankreassaft appliziert.

Jede Stunde wurden 5 ml Pentobarbital verabreicht. Die Versuche dauerten ca. 5 Stunden. Am Versuchsende wurden den Hunden noch 200 ml Vollblut entnommen.

Galle, Pankreassekret und Vollblut wurden in Meßkolben aufgefangen, in denen 1 M HClO_4 war. Das Verhältnis zwischen Saft und 1 M HClO_4 wurde auf 1 : 1 am Ende des Versuchs eingestellt.

3.2. Histaminbestimmungsmethoden

3.2.1. Kationenaustauschermethode (Dowex-Methode)

Zur Bestimmung des Histamins im Vollblut wurden 5ml Blut in ein Zentrifugenglas mit 5,0 ml 1 M HClO_4 versetzt und 5 Minuten bei 1800g zentrifugiert. 4,0 ml des Überstandes wurden abpipettiert und mit 2 M NaOH auf pH 6,5 gebracht (Glaselektrode). Der gesamte Extrakt wurde auf eine kleine, mit Dowex 50 W-X8 gefüllte Säule (0,3 x 2 cm) aufgetragen, die mit 0,1 M Natrium-phosphat-Puffer (pH 6,5) equilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule mit 5,0 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer gewaschen (pH 6,5), dann mit 1 ml bidestilliertem Wasser und mit 5 ml 1 M HCl. Eluiert wird das Histamin mit 3,0 ml 4 M HCl. 1,7 ml dieses Eluates, das mit 3,0 ml H_2O 1:2 verdünnt wurde, wurde mit 0,8 ml 5 M NaOH versetzt und mit 0,1 ml o-Phthaldialdehyd (1% in Methanol) versetzt. Exakt 2 Minuten später wurde 0,6 ml 2 M H_3PO_4 hinzugegeben und die Fluoreszenz bei 360 nm/450 nm im Zeiss Spektrofluorometer gemessen. Die Temperatur betrug $21 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Das so vorbereitete Eluat war mindestens 1 Stunde stabil. Die Fluoreszenz war direkt proportional der Histaminkonzentration in einem Bereich von 1 - 700 ng des Histamindihydrochlorid/ml des verdünnten Eluates. Rückgewinnung von Histamin : 95-100 %, Variationskoeffizient 4,2 % (n = 18).

3.2.2. Butanol - Extraktions - Methode

Nach Shore et al. (1959) wurde 4,0 ml des Überstandes (siehe oben) mit n - Butanol extrahiert. Die organische Phase wurde mit salzgesättigter 0,1 M NaOH gewaschen und Histamin dann mit 0,1 M HCl und n - Heptan wieder in die wässrige Phase überführt.

Die Fluoreszenz war direkt proportional der Histaminkonzentration in einem Bereich von 10-700 ng Histamindihydrochlorid / ml 0,1 N HCl. Das so vorbereitete Eluat war mindestens 30 Minuten stabil. Rückgewinnung von Histamin: 75 - 85 %, Variationskoeffizient 4,0 % (n = 10).

3.2.3. Kombinierte Methode.

Nach der Chromatographie über Dowex 50, wie oben beschrieben, wurden die unverdünnten Eluate mit 5 N NaOH auf einen pH von 11,5 - 12,0 gebracht (Glaselektrode) und 20 Minuten mit 1,5 g reinem NaCl und 10 ml n-Butanol in 25 ml Erlenmeyerkolben mit geschliffenem Glasstopfen auf einer Schüttelmaschine (Bühlæ) geschüttelt. Die weitere Prozedur stimmte mit der von Shore et al. (1959) überein, mit der Ausnahme, daß eine 0,05 %ige o-Phthaldialdehyd Lösung anstatt einer 1 %igen genommen wurde. Rückgewinnung von Histamin : 65 - 75 %, Variationskoeffizient: 5,2 % (n = 10).

3.3. Statistische Berechnung

Die Berechnungen der Mittelwerte, die Varianz und Signifikanz (Student - t - Test erarbeitet) wurden mit einem elektronischen Tischcomputer Olivetti Programma 102 durchgeführt. Außerdem wurde das Median - Percentilsystem für nicht-normal verteilte Stichproben verwendet (Snedecor und Cochran, 1967).

4. Ergebnisse

4.1. Histamin in Blutgefäßen

Die von uns beim Hund ermittelten Histamingehalte in den Gefäßwänden zeigen eine beträchtliche Streuung von Kreislaufabschnitt zu Kreislaufabschnitt.

Im arteriellen Bereich (mit Ausnahme des Splanchnikusgebietes) sind die Histamingehalte ausnahmslos niedrig (Abb. 8). Vergleicht man hierzu nämlich die von Magen oder Lunge (Lorenz et al.1970, 1973a), so betrugen diese 100 bzw. 70 $\mu\text{g/g}$. Innerhalb des arteriellen Bereichs sind aber ebenfalls Unterschiede festzustellen: So nimmt der Histamingehalt der Aorta im abdominalen Bereich zu, gegen die Peripherie hin wieder ab.

Die Histamingehalte im venösen Kreislaufabschnitt (Abb. 9) waren mit Ausnahme von der V. jugularis und subclavia als mittelhoch einzuschätzen. Der höchste Wert wurde in der V. renalis gemessen, der niedrigste in der V.jugularis. Im Bereich der V. cava gab es keine signifikanten Unterschiede. Der intrahepatische Teil war möglicherweise etwas mit Lebergewebe verunreinigt, das sich nicht vollständig abpräparieren ließ.

Im Splanchnikusgebiet (Abb. 10) fiel aber der relativ hohe Histamingehalt von A. gastrica sinistra und A. lienalis auf, während die A. mesenterica im Bereich vor den anderen Arterienabschnitten lag. Die mesenterialen Venen zeigten ohne Ausnahme einen beträchtlichen Histamingehalt. Zur Veranschaulichung sind die Ergebnisse in Abb. 11 und 12 zusammengefaßt.

Gefäßabschnitt	Histamingehalt $\mu\text{g} / \text{g}$
A. coronaria dext.	$2,7 \pm 0,4$
A. pulmonalis	$1,2 \pm 1,6$
Aorta ascendens	$1,9 \pm 1,2$
Aorta (Abgang der großen Gefäße)	$1,8 \pm 0,8$
A. subclavia	$1,7 \pm 0,8$
A. carotis com.	$1,5 \pm 0,7$
Aorta thoracica (oberer Teil)	$2,7 \pm 0,7$
Aorta thoracica (unterer Teil)	$2,6 \pm 1,3$
Aorta abdominalis (Nierenteil)	$4,4 \pm 1,7$
Aorta abdominalis (unterer Teil)	$3,8 \pm 2,8$
A. iliaca com.	$2,7 \pm 2,2$
A. renalis	$4,0 \pm 2,3$

Abb. 8

Histamingehalte der Aorta und unmittelbar aus der Aorta entspringenden Gefäße mit Ausnahme des Splanchnikusgebietes.

Mittelwert $\pm$ S.D. von 6 Versuchen.

Gefäßabschnitt	Histamingehalt $\mu\text{g} / \text{g}$
V. iliaca com.	$6,9 \pm 2,1$
V. renalis	$19,9 \pm 3,8$
V. cava inf. (infrahepatisch)	$6,2 \pm 2,1$
V. cava inf. (intrahepatisch)	$9,2 \pm 5,3$
V. cava inf. (suprahepatisch)	$6,4 \pm 2,9$
V. cava sup.	$6,5 \pm 1,9$
V. cava sup. (Zusammenfluß)	$7,4 \pm 3,6$
V. jugularis	$1,8 \pm 2,3$
V. azygos	$7,0 \pm 3,7$
V. subclavia dextr.	$2,3 \pm 0,4$
V. pulmonalis	$6,6 \pm 1,8$

Abb. 2

Histamingehalte in Gefäßen des Niederdrucksystems (Venen).

Mittelwerte $\pm$ S.D. von 6 Versuchen.

Gefäßabschnitt	Histamingehalt $\mu\text{g} / \text{g}$
Tripus Halleri	$3,8 \pm 1,2$
A. hepatica com.	$8,6 \pm 5,4$
A. gastrica sin.	$19,2 \pm 8,9$
A. lienalis	$11,9 \pm 5,7$
A. mesenterica	$2,6 \pm 1,5$
V. mesenterica	$10,7 \pm 3,5$
V. lienalis	$18,7 \pm 7,8$
V. gastrica	$13,2 \pm 5,8$
V. portae	$8,9 \pm 3,4$

Abb. 10

Histamingehalte in Gefäßen des Splanchnikusgebietes.

Mittelwerte $\pm$ S.D. von 6 Versuchen.

. CAROTIS COM.

. SUBCLAVIA

A. PULMONALIS

A. CORONARIA
DXT.

A. RENALIS

A. ILLIACA COM.

TRUNCUS
BRACHIO-
CEPHALICUS

A. CAROTIS COM. SIN.

A. SUBCLAVIA SIN.

AORTA
THORACICA

TRUNCUS
COELIACUS

TRIPUS
HALLERI

A. LIENARI

AORTA
ABDOMINA-
LIS

A. HEPATICA
COM.

A. GASTRICA
SIN.

A. CYSTICA

A. GASTROEPIPLO-
ICA

A. MESENTERICA SUP.

A. MESENTERICA
INF.

Abb. 11

Histamingehalte in Gefäßen des arteriellen
Kreislaufs.

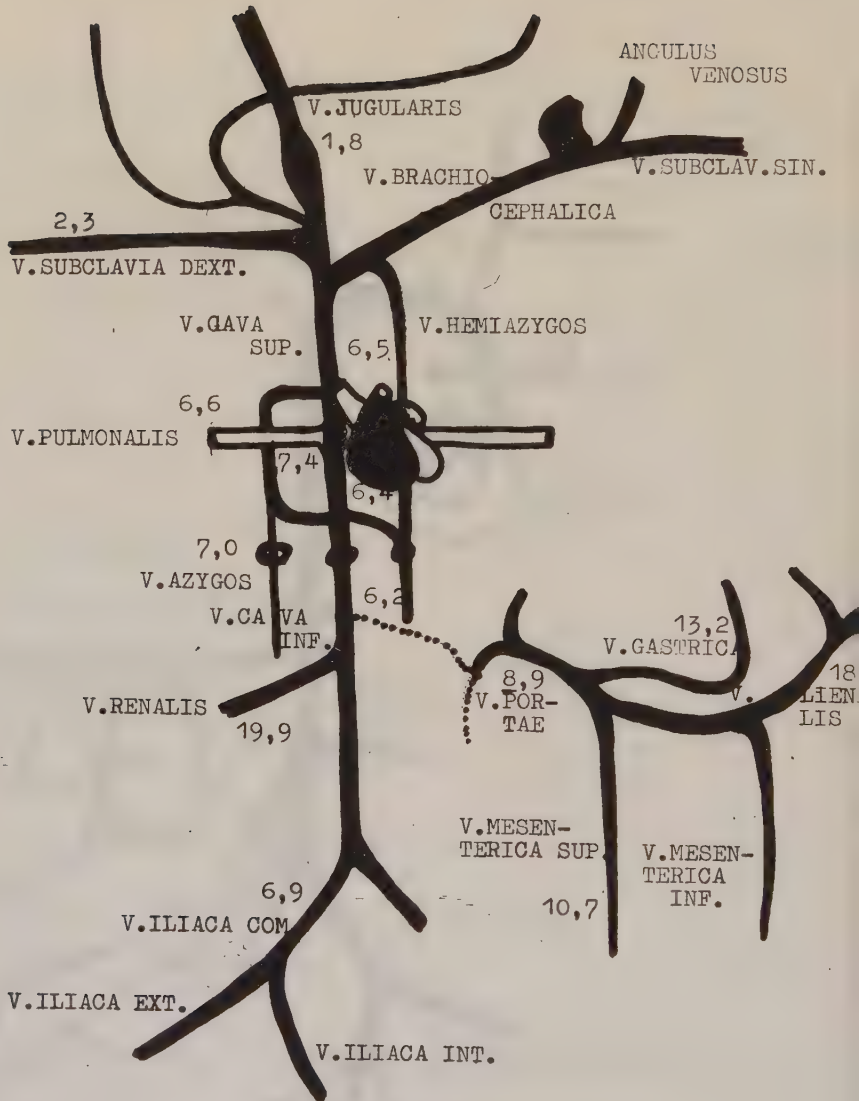


Abb. 12

Histamingehalte in Gefäßen des venösen Kreislaufs.

4.2. Histaminbestimmungsmethoden im Vollblut

Beim Vergleich von 6 Kombinationen von fluorometrischen Methoden (Abb. 13 u. 14) für die Bestimmung von Histamin im Vollblut fiel besonders der Abfall der Reagenzienleerwerte in allen Modifikationen mit 0,05 % o - Phthaldialdehyd auf. Dies war auch beim Umkehrwert zu erkennen und muß auf die Eigenfluoreszenz des o - Phthaldialdehyd zurückgeführt werden.

Die Ausbeute war signifikant bei 0,05 % o - Phthaldialdehyd niedriger als bei 1 % ($p < 0,02$).

Dies geht sowohl auf die Verminderung bei der Schüttel- wie der Dowexmethode zurück ($p < 0,05$ und $p < 0,005$).

Histamin kam, wie die Identifizierung zeigte, im Vollblut der Tiere aus Marburg vor, aber viel geringer, als die Dowexmethode vermuten ließ (Abb. 14). Der Faktor war bei 1 % - o - Phthaldialdehyd 1 : 20 ! 1 % - o - Phthaldialdehyd ist absolut unbrauchbar.

Ob tatsächlich die Bestimmung von Histamin im Vollblut mit der kombinierten Methode mit 0,05 % o - Phthaldialdehyd zuverlässig war, mußte bewiesen werden.

Ansätze	1% o-PD (n=6)			0,05 % o-PD (n=6)		
	Shore	Dowex	Kombiniert	Shore	Dowex	Kombiniert
Reagenzien-leerwert (FU)	23 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3	21 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2
Umkehr-leerwert (FU)	22 $\pm$ 2	21 $\pm$ 4	19 $\pm$ 3	11 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2
Ausbeute (%)	85 $\pm$ 9	105 $\pm$ 8	72 $\pm$ 12	74 $\pm$ 6	91 $\pm$ 4	57 $\pm$ 4

Abb. 13

Leerwerte und Ausbeuten bei verschiedenen Isolierungstechniken und o - Phthaldialdehydkonzentrationen zum Nachweis von Histamin im Vollblut des Hundes.

Mittelwerte $\pm$ S.D. ; o - PD = o - Phthaldialdehyd.

Beim Reagenzienleerwert lief 4 ml 0,5 M HClO₄

jeweils über die gesamte Prozedur; der Umkehrwert wurde aus dem Vollblut durch Mischen aus 4 Ansätzen gewonnen. Die Ausbeute wurde durch Zusatz von 10 bzw. 100ng Histamin zum Vollblut als internen Standard ermittelt. Eichkurven wurden für alle Bedingungen getrennt erstellt. (1 % und 0,05 % o - Phthaldialdehyd, Dowex und Shore bzw. kombinierte Methode). Fluoreszenz - Standard 11450 = 40 FU (vgl. Lorenz et al. 1974).

o - PD Konzentration ($\frac{1}{\%}$)	Histaminäquivalent (ng/ml Vollblut)		
	Shore	Dowex	Kombiniert

1,0	55,6 $\pm$ 12,5	94,0 $\pm$ 27,4	5,4 $\pm$ 2,2
0,05	7,8 $\pm$ 1,4	40,0 $\pm$ 11,7	4,2 $\pm$ 1,6

Abb. 14

Histamin und andere Substanzen im Vollblut des Hundes, die mit o - Phthaldialdehyd (o-Pd) Fluorophore bilden : Abhängigkeit des Nachweises von Isolierungstechnik und der o - Phthaldialdehydkonzentration.

Mittelwerte $\pm$ S.D. von 3 Hunden. Jeder Einzelwert ist Mittelwert aus 2 Bestimmungen an 2 verschiedenen Tagen und 4 Bestimmungen am selben Tag.

Alle Werte anhand Ausbeute korrigiert.

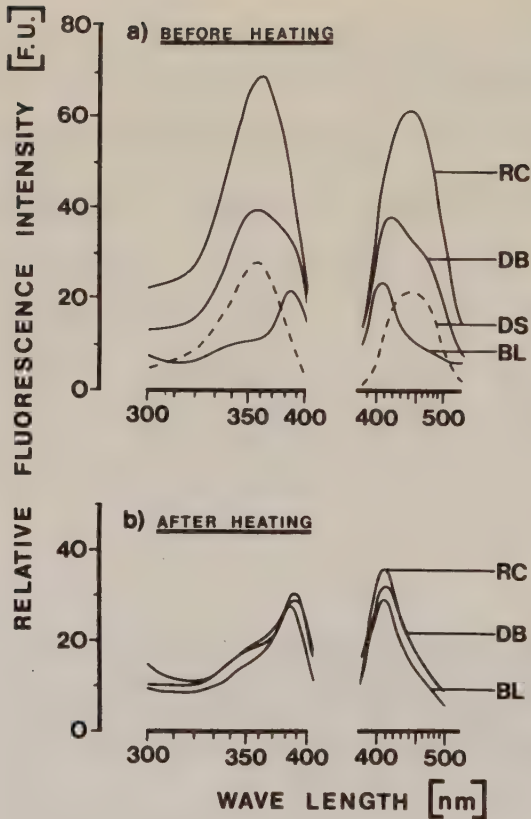


Abb. 15

Fluoreszenzspektren einer Kontrollprobe aus dem Mischblut von 64 Münchner Hunden und die Spektren einer Kontrollprobe, der authentischen Histamin zur Ausbeutebestimmung beigelegt wurde.

a) vor dem Kochen b) nach dem Kochen

RC= Ausbeute nach Histaminzusatz

DB= Hundevollblut

DS= Differenzspektrum zwischen Hundevollblut und Blank

BL= Blank

In Abb. 15 wurden die Fluoreszenzspektren einer Kontrollprobe aus dem Mischblut von 64 Münchner Hunden dargestellt. Dazu kamen die Spektren einer Kontrollprobe, der authentisches Histamin zur Ausbeutebestimmung beigelegt wurde, und die Spektren des Reagenzienblanks, bei dem anstelle von Hundevollblutextrakt nur 4 ml 0,4 M HClO_4 über die gesamte Prozedur geschickt wurde. Die Spektren der Kontrollprobe und die von Histamin stimmten überein. Nach Kochen war die gesamte Fluoreszenz verschwunden, die zwischen Blank und Proben gefunden wurde. Damit war nach diesen beiden Kriterien im Hundevollblutextrakt nach Dowex 50 - Chromatographie und Butanol-extraktion nur Histamin fluorometrisch bestimmt worden.

Da es aber denkbar war und auf Grund der unten dargestellten Ergebnisse auch wahrscheinlich ist, daß Einzelproben sich anders verhalten könnten als das Mischblut, wurden bei den 64 Hunden auch in 59 Einzelfällen Spektren, und Spektren nach Kochen aufgenommen, in allen Fällen zusammen mit dem Reagenzienblank und der oben dargestellten Kontrollprobe. Dies war von besonderer Wichtigkeit bei den Tieren, die einen sehr hohen Histamingehalt im Vollblut aufwiesen. Dabei konnte in allen Fällen Histamin mit den beiden Kriterien identifiziert werden. Damit ist die kombinierte Methode spezifisch für die Bestimmung von Histamin im Hundevollblut.

Mit der kombinierten Methode wurden nun folgende Normalwerte für Histamin im Hundevollblut erzielt (Abb. 16).

Die Histamingehalte des Hundevollblutes zeigten zwischen München und Marburg beträchtliche Unterschiede. Die Marburger Tiere wiesen im Dichtemittel etwa 4 mal soviel Histamin auf wie die Münchner Tiere. Der Median für die letzten betrug dabei nur 1,7 ng / ml, war also erheblich niedriger als die Werte in der Weltliteratur (Abb. 6).

Die Verschiebung der Werte nach links bei den Münchner Tieren zeigte sich auch in der Anzahl der Tiere, die keinen messbaren Histamingehalt im Vollblut besaßen (0 = weniger als 100 pg/ml). Bei den Marburger Tieren war dies nur 4 mal der Fall (7,3 %), bei den Münchner Tieren dagegen 9 mal (14,1%). Dagegen waren die oberen Extremwerte bei den Kollektiven nicht wesentlich verschieden. Die Streuung der Meßwerte war bei beiden Stichproben auf prozentualer Basis gleich, ebenso die Häufigkeitsverteilung im Histogramm mit einer erheblichen Schiefe der Werte nach rechts.

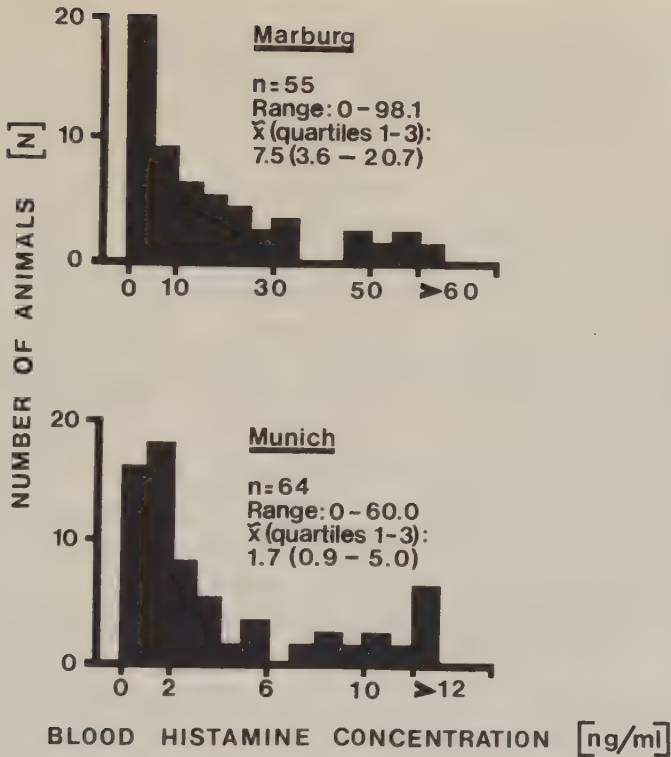


Abb. 16

Histaminkonzentrationen im Hundevollblut.
Histogramme, Bereiche, Mediane und Quartile
von zwei Stichproben aus Marburg und München.
Sonstige Bedingungen siehe Material und Methodik.

4.3. Bestimmungsmethoden für Histamin in
Galle und Pankreassaft: Ausschluß
der Anwesenheit von Histamin.

Die Abb. 17 zeigt, daß die Reagenzienleerwerte wie beim Blut sind. Die Umkehrwerte sind dagegen ausgesprochen hoch, unabhängig von o - Phthaldialdehyd, also kann es sich nur um Eigenfluoreszenz handeln, die nur durch die kombinierte Methode verringert, aber nicht beseitigt wird. Nach Abzug der entsprechenden Umkehrwert war k e i n Histamin in der Galle vorhanden (Abb. 18).

Mit Pankreassaft waren die Leerwerte und Umkehrwerte so niedrig wie beim Vollblut. Dafür waren aber die Ausbeute beim Schütteln allein relativ schlecht (Abb. 19). Bei Verwendung der kombinierten Methode wurde k e i n Histamin im Pankreassaft nachgewiesen. (Abb. 20)

Ansätze	1% o - PD (n = 6)			0,05% o - PD (n = 6)		
	Shore	Dowex	Kombiniert	Shore	Dowex	Kombiniert
Reagenzien leerwert (FU)	23±4	21±4	24±3	12±1	13±2	13±2
Umkehr- leerwert (FU)	394±70	76±24	55±11	396±89	74±28	45±4
Ausbeute (%)	82±7	105±6	64±3	75±10	101±9	60±7

Abb.17

Leerwerte und Ausbouts bei verschiedenen Isolierungs-
techniken und o - Phthalaldialdehydkonzentrationen zum
Nachweis von Histamin in der Lebergalle des Hundes.

Mittelwerte $\pm$ SD; o - PD = o - Phthalaldialdehyd.
Beim Reagenzienleerwert lief 4 ml 0,5 M HClO₄ jeweils
über die gesamte Prozedur, der Umkehrwert wurde aus der
Galle durch Mischen aus 4 Ansätzen gewonnen. Die Aus-
beute wurde durch Zusatz von 10 bzw. 100 ng Histamin
zur Galle als internen Standard ermittelt. Eichkurven
wurden für alle Bedingungen getrennt erstellt. (1 %
und 0,05 % o - Phthalaldialdehyd, Dowex und Shore bzw.
kombinierte Methode).

o - PD Konzentration (%)	Histaminäquivalent (ng / ml Galle)		
	Shore	Dowex	Kombiniert

1,0	88,8 $\pm$ 33,8	12,6 $\pm$ 20,0	8,9 $\pm$ 12,6
0,05	81,7 $\pm$ 33,3	14,5 $\pm$ 24,8	0 $\pm$ 0

Abb. 18

Substanzen in der Lebergalle des Hundes, die mit und ohne o - Phthaldialdehyd Fluorophore bilden: Abhängigkeit des Nachweises von der Isolierungstechnik und der o - Phthaldialdehydkonzentration.

Mittelwert $\pm$ S.D. von 3 Hunden, jeder Einzelwert ist Mittelwert aus 2 Bestimmungen am selben Tag. Bezug der Werte auf den Umkehrwert, korrigiert nach Ausbeute.

Ansätze	1% o - PD (n = 7)			0,05 % o - PD (n = 6)		
	Shore	Dowex	Kombiniert	Shore	Dowex	Kombiniert
Reagenzien-leerwert (FU)	24 $\pm$ 2	20 $\pm$ 5	23 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3	13 $\pm$ 3
Umkehr-leerwert (FU)	20 $\pm$ 5	19 $\pm$ 5	21 $\pm$ 6	11 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3
Ausbeute (%)	69 $\pm$ 15	107 $\pm$ 9	60 $\pm$ 9	63 $\pm$ 13	104 $\pm$ 16	57 $\pm$ 6

Abb. 19

Leerwerte und Ausbeuten bei verschiedenen Isolierungstechniken und o - Phthaldialdehydkonzentrationen zum Nachweis von Histamin im Pankreassekret des Hundes.

Mittelwerte $\pm$ S.D.; o - PD = o - Phthaldialdehyd. Beim Reagenzienleerwert lief 4 ml 0,5 M HClO₄ jeweils über die gesamte Prozedur, der Umkehrwert wurde aus den Pankreasgeweben durch Mischen aus 4 Ansätzen gewonnen. Die Ausbeute wurde durch Zusatz von 10 bzw. 100 ng Histamin zum Pankreassaft als internen Standard ermittelt. Eichkurven wurden für alle Bedingungen getrennt erstellt. (1 % und 0,05 % o - Phthaldialdehyd, Dowex und Shore bzw. kombinierte Methode). Fluoreszenz-Standard 11450 = 40 FU (vgl. Lorenz et al. 1974).

o - PD Konzentration (%)	Histaminäquivalent (ng / ml Pankreassaft)		
	Shore	Dowex	Kombiniert

1,0	3,8 $\pm$ 3,2	7,1 $\pm$ 3,9	1,5 $\pm$ 1,5
0,05	0 $\pm$ 0	2,4 $\pm$ 1,6	0 $\pm$ 0

Abb. 20

Substanzen im sekretinstimulierten Pankreassaft des Hundes, die mit o - Phthaldialdehyd (o - PD) Fluorophore bilden : Abhängigkeit des Nachweises von der Isolierungstechnik und der o - Phthaldialdehydkonzentration.

Mittelwerte $\pm$ S.D. von 3 Hunden, jeder Einzelwert ist Mittelwert aus 2 Bestimmungen an 2 verschiedenen Tagen und 4 Bestimmungen am selben Tag.

5. Diskussion

5.1. Histamin in Gefäßwänden

Histamin kommt in der Wand von Blutgefäßen beim Hund in unterschiedlich hoher Konzentration vor. Im Durchschnitt sind die Werte als relativ niedrig einzustufen, wenn man bedenkt, daß Magen, Darm und Lunge etwa 100 $\mu\text{g/g}$ Histamin enthalten (Lorenz et al., 1973). In Gefäßen des Splanchnikusgebietes und in den Venen sind dagegen die Histamingehalte relativ hoch. Dies entspricht der Verteilung der Mastzellen (s. Einleitung), hat aber bis heute keine physiologische Erklärung. Man könnte allerdings spekulieren, daß im Gastrointestinaltrakt generell Histamin am meisten vorkommt (Lorenz et al., 1973) und damit durch genetische oder hormonelle Determination hier die meisten Mastzellen entstehen und reifen. Diese Erklärung aber trifft auf die Venenwände generell nicht zu.

Der geringe Histamingehalt arterieller Gefäße im Vergleich zu den Venen, ist ebenfalls schwer zu erklären. In anderen glatten Muskeln, z.B. im Gastrointestinaltrakt, kommen Histamin und Mastzellen reichlich vor, wenn auch nur zu etwa $1/3 - 1/4$ des Gehaltes und der Anzahl, die in den Schleimhäuten derselben Region gefunden wurden (Lorenz et al. 1969). Dies ergibt aber noch immer einen Histamingehalt von etwa 20 - 40 $\mu\text{g/g}$. Die Zunahme der Mastzellen in atherosklerotischen Gefäßen würde allerdings zur Zunahme des Histamingehaltes in der Aorta von Shore et al. (1959) nach abdominal passen. Phospholipide und Fettsäuren sind Histaminliberatoren von hoher Potenz (Lorenz et al., 1977).

5.2. Histaminbestimmung in Geweben und Körperflüssigkeiten.

Für die Bestimmung des Histamingehaltes von Geweben ist die fluorometrische Methode mit allen drei Kombinationen für die Isolierung des Amins (Butanol-extraktion, Dowexverfahren und kombinierte Methode) voll befriedigend (Lorenz et al., 1973). In einer großen Anzahl von menschlichen und tierischen Geweben stimmten die Resultate der fluorometrischen Methoden mit denen des Bioassay gut überein, wenn der Histamingehalt mehr als $1 \mu\text{g/g}$ war.

Die relativ hohe Zuverlässigkeit dieses Analyseverfahrens beruht auf zwei Faktoren:

1. Die Fluoreszenz - Intensität des Histamin - o - Phthaldialdehyd - Komplexes übersteigt mit mehr als 1 oder 2 Größenordnungen die aller anderen bekannten o - Phthaldialdehyd - Komplexe mit anderen Aminen, z. B. mit Aminosäuren, Peptiden oder Polyaminen, wie Spermin und Spermidin.

2. Die Histaminkonzentrationen in den meisten Geweben sind viel höher als die anderer biogener Amine, die nur in Teilen eines μg oder in weniger $\mu\text{g/g}$ vorkommen, wie Azetylcholin, Serotonin und die Katecholamine. Die folgenden Substanzen sind bekannt dafür, Fluorophore mit o - Phthaldialdehyd zu bilden: Spermidin (Kremzner und Pfeiffer, 1966); Spermin (Lorenz et al., 1970); Histidin (Shore et al., 1959); Arginin (Cohn et al., 1961); Histidylhistidin (Shore et al., 1959); Agmatin (Cohn et al., 1961); Glutathion (reduziert) (Shelley et al., 1966); Citrullin (Shelley et al., 1966); Ammoniak (Shore et al., 1959). Alle diese Substanzen werden

von Histamin durch Chromatographie auf Dowex 50 oder durch die ioninierte Methode abgetrennt. Die Konzentrationen, die dabei gestartet wurden, waren meist höher als die, die in Geweben vorkommen (Lorenz et al. 1970a).

Es gibt aber Substanzen, die die fluorometrische Methode dadurch stören, daß Sie das in großem Überschuß zugefügte o - Phthalaldehyd verbrauchen oder durch Absorption des Ausgangslichtes bei 360 nm die Fluoreszenzentwicklung verhindern. Aminoguanidin, Thyrostatica vom Typ der Thioimidazole und Thiouracile sind Beispiele dafür (Lorenz et al., 1970), aber sie können von Histamin durch Butanolextraktion oder Chromatographie an Dowex 50 abgetrennt werden.

Da es in Geweben und Körperflüssigkeiten eine schier unbegrenzte Anzahl von Aminosäuren, Peptiden, Aminen etc. gibt, die mit der fluorometrischen Methode im Einzelfall interferieren können, sollte die Substanz, die aus dem jeweiligen Gewebe erstmals isoliert wird, sorgfältig identifiziert werden. Dies gilt besonders für den Fall, daß die Histaminkonzentration unter $1\mu\text{g/g}$ liegt und daß eine Körperflüssigkeit untersucht wird (Lorenz et al., 1973). Bei Geweben, die mehr als $1\mu\text{g/g}$ Histamin enthalten, sollten die Ergebnisse der fluorometrischen Analyse durch die Bioassays unter Anwendung von höchst spezifischer Antihistaminica kontrolliert werden (pH_2 - Werte).

Die Bestimmung von Histamin in Geweben und Körperflüssigkeiten ist kein Selbstzweck, sondern dient in erster Linie dem Nachweis von Histaminfreisetzung unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Auch nach Arzneimitteln läßt sich Histaminfreisetzung als pharmakologischer Effekt nachweisen (Lorenz, 1975).

Die Zuverlässigkeit der Methodik für Histaminfreisetzung kann heute als befriedigend angesehen werden, vorausgesetzt, daß verschiedene Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- 1.) Es muß geprüft werden, ob nach der Anwendung eines Präparates spezifisch Histamin bestimmt wird und nicht das Präparat oder Metaboliten des Präparates.
- 2.) Die Reinheit der Reagenzien und die Dekontaminierung aller Teile der Apparatur sogar von " Spuren " von Histamin muß sorgfältig überprüft werden.
- 3.) Nebeneffekte eines Arzneimittels auf Histaminabbau und Histaminaufnahme oder eine Bindung an Histamin - Rezeptoren sollten geprüft werden. Sie beeinflussen wesentlich die Bestimmung der Histaminguantitäten, die von Geweben oder von einzelnen Histamin enthaltenden Zellen, z.B. den Basophilen des Blutes, freigesetzt werden.

Bemerkenswerterweise " verschwindet " Histamin aus einigen Körperflüssigkeiten, wenn die Methoden seines Nachweises spezifischer werden. Ein Musterbeispiel hierfür ist das Vollblut des Hundes, dessen Histamingehalt äußerst niedrig ist, sowie Galle und Pankreassaft. Die Annahme, Histamin kommt überall vor, hat Histamin hinsichtlich seiner spezifischen Funktionen viel geschadet. Deshalb erscheint es gegenwärtig fast wichtiger, festzustellen, wo Histamin überall **n i c h t** eine Rolle spielt, als sein Vorkommen positiv zu bestätigen. Ein Beispiel hierfür sind die Dextranzwischenfälle in der Klinik, die nicht mit Histaminfreisetzung aus Plasma verbunden sind, obwohl sie unter dem Vollbild des anaphylaktischen Schocks ablaufen (Lorenz, 1975).

6. Zusammenfassung

1. Es wurden systematisch die Histamingehalte im Gefäßsystem des Hundes bestimmt. Grundsätzlich wurden in allen Gefäßwänden Histamin nachgewiesen. Dabei fiel aber auf, daß die Histamingehalte in Arterien wesentlich niedriger waren als in Venen. Außerdem war der hohe Histamingehalt in Gefäßen des Splanchnikusgebietes besonders auffällig. In der Aorta wurde Histamin vor allem im abdominalen Bereich gefunden. Eine Beziehung zur Atherosklerose wurde diskutiert.
2. Im Vollblut des Hundes wurden die bisherigen Histaminbestimmungsmethoden überprüft und nur die kombinierte Methode mit ausreichender Spezifität nachgewiesen. Die Identifizierung des Histamins im Vollblut der Tiere aus Marburg zeigte einen viel geringeren Histamingehalt als die Dowexmethode es vermuten ließ. 1 % o - Phthaldialdehyd, wie bisher verwendet ist absolut unbrauchbar. Nur die kombinierte Methode (Butanolextraktion und Ionenaustauschchromatographie an Dowex 50) mit einer Zugabe von 0,05 % o - Phthaldialdehyd ist für die Histaminbestimmung im Vollblut zuverlässig.
3. Die Normalwerte für Hundevollblut wurden für zwei Kollektive aus Marburg und München festgelegt. Dabei wurden signifikante Unterschiede festgestellt.
4. Für Galle und Pankreassaft wurde die Spezifität der bisherigen fluorometrischen Histaminbestimmungsmethoden überprüft. Sie ergaben, daß weder in Galle noch im Pankreassaft Histamin vorhanden ist.

7. Literatur

Anrep G. V. und Barsoum G. S. (1935).

Distribution of histamine between plasma and red blood corpuscles. J. Physiol. 85, 36-37.

Barsoum G.S. und Gaddum J.F. (1935).

The pharmacological estimation of adenodine and histamine in blood. J. Physiol. (London) 85, 1-13.

Behrmann V.G., Schelling V. und Hartmann F.W. (1945).

Blood histamine levels in experimental burns. Amer. J. Physiol. 145, 483-490.

Boreus L.O. und N. Chakravarty (1960).

The histamine content of guinea pig mast cells. Experientia 16, 192.

Brocklehurst W.E. (1960).

The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. J. Physiol. (London) 151, 416-435.

Brodie B.B., Beaven M.A., Erjavec F. und Johnson H.L. (1966).

Uptake and release of H - histamine, in: Mechanisms of release of biogenic amines, **Weimer-Gren Center Intern. Symp. Series**, Vol. 5, U.S. von Euler, S. Rosell und Uvnäs B. (Ed.), Pergamon Press, Oxford, 401-415.

Büttner H., Hansert E. und Stamm D.,
Auswertung, Kontrolle und Beurteilung von
Messergebnissen, in: Handbuch der enzyma-
tischen Analyse (Ed. H.U. Bergmeyer :
Verlag Chemie 1970), p. 281.

Carlini E.A. und Green J.P. (1963).
The subcellular distribution of histamine,
slow-reacting substance and 5-hydroxytryptamine
in the brain of the rat. Brit. J. Pharmacol.
20, 264-277.

Chakravarty N. (1960).
The mechanism of histamine release in
anaphylactic reaction in guinea pig and
rat. Acta physiol. scand. 48, 146-166.

Code C.F. (1937).
The quantitative estimation of histamine
in the blood. J. Physiol. (London)
89, 257-268.

Code C.F. und Ing H.R. (1937).
The isolation of histamine from the white
cell layer of centrifugated rabbit blood.
J. Physiol. (London) 90, 501-510.

Code C.F. (1939).
The histamine content of the blood of guinea
pigs and dogs during anaphylactic shock.
Amer. J. Physiol. 127, 78-93.

Code C.F. und Jensen J.L. (1941).
A comparison of the histamine content of
blood and bone marrow. Amer. J. Physiol.
131, 768-775.

Code C.F. und Mitchell R. G. (1957).

Histamine, eosinophils and basophils in the
blood. J. Physiol. (London) 136, 449-468.

Cohn, V.H., Jr., Shore P.A.:

Anal. Biochem. 2, 237 (1961).

Emmelin N., Kahlson G. und Wicksell F. (1941).

Histamine in Plasma and methods of its estimation.
Acta Physiol. Scand. 2, 123-142.

Fernex M. (1968).

The mast-cell system. Its relationship to
atherosclerosis, fibrosis and eosinophils.

S. Karger, Basel.

Mahn F. und Wellmann B. (1952).

Experimentelle Untersuchungen über Histamin-
freisetzung durch künstliche Blutersatzmittel.
Klin. Wschr. 30, 998-999.

Halpern B.N., Briot M., Liacopoulos P., Neveu Th. und
Branellec A. (1956).

Histamin-lockende Eigenschaften eines Butyl-
aminderivates (1935 L) beim Hund. C.r.Soc.
Biol. (Paris) 150, 1302-1306.

Minshaw L.B., Jordan M.M. und Vick J.A. (1961).

Mechanism of histamine release in endotoxin
shock. Amer. J. Physiol. 200, 987-989.

Jorpes E., Holmgren H. und Wilander O. (1937).

Über das Vorkommen von Heparin in den
Gefäßwänden und in den Augen. Zschr.
mikros. anat. Forschg. 42, 279.

Jorpes E. (1938).

Über das Heparin und seine Anwendung als Ersatzmittel für Oxalat und Zitrat in der Klinik. Acta med. scand. suppl. 89, 139.

Juhlin L. und Melley W. B. (1966).

Detection of histamine by a new fluorescent o- Phthaldialdehyd stain. J. Histochem. Cytochem. 14, 525-528.

Juhlin L. (1967).

Determination of histamine in small biopsies and histological sections. Acta physiol. scand. 71, 30-36.

Kadykow B.I. und Federowa A.V. (1956).

Über die Bildung der Histaminase und ihren Eintritt in das lymphatische System. Ber. Acad. Wiss. UdSSR 110, 1038-1040.

Kremzner L.T. und Pfeiffer C.C. (1966).

Identification of substances interfering with the fluorometric determination of brain histamine. Biochem. Pharmacol. 15, 187-200.

Lindell S.E. und Westling H. (1966).

Histamine metabolism in man. In: Histamine and Antihistaminics. Handbuch der experim. Pharmakologie, Eichler O. und Farah A. (Ed.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 734-788.

Lorenz W., Haubensak G., Hutzler M. und Werle E. (1968).
Histaminliberierung und Sekretionsstimulierung
in der Gl. submaxillaris und im exokrinen
Pankreas durch Parasympathihormonata, Peptid-
hormone, Histamin und Mepyramin. Naunyn-Schmiede-
bergs Arch. Pharmacol. exp. Path. 260, 416-437.

Lorenz W., Sahauer A., Halbach St., Calvoer R. und
Werle E.
Biochemical and histochemical studies on the
distribution of histamine in the digestive tract
of man, dog, and other mammals. Naunyn-Schmiede-
bergs Arch Pharm. exp. Path. 265, 81-100 (1969).

Lorenz W., Barth H., und Werle E. (1970a).
Histamine and histamine methyltransferase in
the gastric mucosa of man, pig, dog and cow.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. 267, 421-432.

Lorenz W., Benesch L., Barth H., Matejka E., Meyer R.,
Kusche J., Hutzler M. and Werle E. (1970)
Fluorometric assays of histamine in tissues
and body fluids: Choice of the purification
procedure and identification in the nanogram
range. Z. Analyt. Chem. 252, 94-98.

Lorenz W., Barth H., Kusche J., Reimann H.J., Schmal A.,
Matejka E., Mathias Ch., Hutzler M. and Werle E.:
(1971).
Histamine in the Pig. Determination, Distribution,
Release and Pharmacological Actions. Europ.
J. of Pharmacol. 14, 155.

- Lorenz W., Ruhnd A., Kusche J., Barth H., Haubensak G.,
Hutzel M., Schmal A., Gerant M., Wüchter A.,
Matejka E., Hahn H., and Werle E.: (1973).
Histamine and salivary secretion. In: Cz.
Maśliński, Histamine.
Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg,
Pennsylvania, p. 187-200.
- Lorenz W., Reimann H.J., Barth H., Kusche J., Meyer R.,
Doenicke A. and Hutzel M.: (1972).
A sensitive and specific method for the deter-
mination of histamine in human whole blood
and plasma.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 911-920.
- Lorenz W., Matejka E., Schmal A., Seidel W., Reimann H.-J.,
Uhlig R. and Mann G. (1973).
A phylogenetic study on the occurrence and
distribution of histamine in the gastro-
intestinal tract and other tissues of man
and various animals. Comp. Gen. Pharmacol.
4, 229-250.
- Lorenz W., Thermann M., Messmer K., Schmal A., Dormann P.,
Kusche J., Barth H., Tauber R., Hutzel M.,
Mann G., and Uhlig R. (1974).
Evaluation of histamine elimination curves
in plasma and whole blood of several circulatory
regions: A method for studying kinetics of
histamine release in the whole animal. Agents
and Actions 4, 336-356.

Lorenz W., Barth H., Thermann M., Schmal A., Dormann P.
and Niemeyer I. (1974 a).

Fluorometric histamine determination in canine
plasma under normal conditions, following
application of exogenous histamine and during
histamine release by Haemaccel^(R). Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem. 355, 1097-1111.

Lorenz W., (1975).

Histamine release in man
Agents and Actions 5, 402

Thermann M., Lorenz W., Schmal A., Schingale F., Dormann P.,
Hamelmann H. (1977)

Influence of H₁- and H₂- receptor antagonists on
the circulatory system and on the endogenous
plasma histamine levels of the dog.
Agents and Actions.

Magazinović V.B., Hamamdžić M. und Paolić S. (1966).

Histamine and the evolution of haemorrhagic
hypotension. Acta Physiol. Acad. Sci.
Hungar 30, 269-274.

Mendes Fagundes J.J. (1949).

O problema da cromotropia da parede vascular e
das Mastzellen peri-vasculares. Amat. lusit. 7, 253.

Michaelson I.A. und Coffman P.Z. (1967).

Histamine and spermidine in tissues of the
guinea pig. Biochem. Pharmacol. 16, 1636-1671.

Minard D. (1941).

The presence and distribution of histamine in
blood. Amer. J. Physiol. 132, 327-335.

Mongar J.L. und Schild H.O. (1952).

A comparison of the effects of anaphylactic shock and of chemical histamine releasers.

J. Physiol. (London) 118, 461-478.

Mundy R. L., Demarre G.E., Jakobus D.P. und Heiffer M.H. (1967).

Beta-Mercaptoethylamine and cystamine-induced histamine release in the dog.

Arch. int. pharmacodyn. 165, 64-70.

Riley J.F. und West G.B. (1953).

The presence of histamine in tissue mast cells.

J. Physiol. (London) 120, 528-537.

Rocha E Silva, M. (1966).

" Histamine and antihistaminies " in Hand-book of Experimental Pharmacology (ed. Eichler and Farah), vol. 18, p. I. Heidelberg: Springer.

Shelley W.B., Juhlin L.: (1966).

J. Chromatog. 22, 130.

Shore P.A., Burkhalter A. und Cohn V.H., jr. (1959).

A method for the fluorometric assay of histamine

in tissues. J. Pharmacol. Exp. Therap. 127, 182-186.

Snedecor G.W. and Cochran W.G. (1967).

Statistical Methods, 6th ed. (The Iowa State University Press, Ames Iowa).

Stone I, L., Menill I. M. und Menechy G. R. (1955).

Distribution of histamine in human tissues.

Fed. Proc. 14, 147-148.

Schayer R.W. (1961).

Significance of induced synthesis of histamine in physiology and pathology. *Chemotherapia* 3, 123.

Schayer R.W. (1962).

Evidence that induced histamine is an *intrinsic* regulator of the microcirculatory system. *Amer. J. Physiol.* 202, 66.

Thompson W.L. und Walton R. . (1974).

Elevation of plasma histamine levels in the dog following administration of muscle relaxants, opiates and macro molecular polymers. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 143, 131-135.

Tinel J., Ungar G. und Parrot J.L. (1938).

Sur l'histaminémie plasmatique et globulaire. Son évolution au cours du choc peptonique du Chien. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 129, 267.

Ungar B. und Pocoulé P.AG (1937).

Sur les voies délimination de l'histamine et son absence dans les urines normales. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 124, 1204-1206.

Vurek G.G., Prager D.J. und Feigen G.A. (1967).

Antibody concentration and temperature as determinants of *in vitro* sensitization and histamine release in isolated cardiac tissues. *J. Immunol.* 99, 1243-1253.

Weinshelbaum E.J. und Ferguson D.H.J. (1966).
Localization of carbon-14 from histamine
in enterochromaffin cells. Gastro-
enterology 51, 1028.

West G.B. (1959).
Tissue mast cells and tissue amines.
J. Pharm. Pharmacol. 11, 513-534.

Zeppa R., Grossekreutz D.C. und Sugioka K. (1961).
Histamine release into the circulation by
Meperidine (Demerol ^R). Proc. Soc.
exp. Biol. Med. 106, 794-796.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. W. Lorenz danke ich für die Überlassung des Thomas und eines Arbeitsplatzes sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Herrn Anton Schmal und Frau Petra Dormann, für ihre stets bereite Hilfe.

L e b e n s l a u f

Am 15. Juni 1944 wurde ich als Sohn des Zahntechnikermeisters Josef Rückert und seiner Ehefrau Käthe in Langenbielau/Schlesien geboren.

- 1950 - 1955 Grundschule in Friedberg/Hess.
- 1962 Mittlere Reife am Gymnasium (Augustinerschule) in Friedberg
- 1962 - 1965 Zahntechnikerlehre in Frankfurt und Bad Nauheim
- 1965 Gesellenprüfung für das Zahntechnikergewerbe in Frankfurt
- 1965 - 1967 Wehrdienst in München
- 1968 - 1970 Anstellung als Zahntechniker im Zahntechn. Laborat. G.Honisch in München
- Vorbereitung im Selbststudium auf die Reifeprüfung
- 1970 Reifeprüfung vor dem bayerischen Kultusministerium in München abgelegt.
- 1970 Beginn des Studiums der Zahnmedizin in Marburg/Lahn
- 1973 Physikum in Marburg
- 1975 Staatsexamen der Zahnmedizin in Marburg und Approbation als Zahnarzt
- 1976 Eheschließung mit Elisabeth Pöschl

Zur Zeit arbeite ich als Assistenzarzt
in Freyung / Ndb. .

In den klinischen Semestern erhielt ich
meine Doktorarbeit an der Chirurgischen
Universitätsklinik in Marburg in der
Abteilung für experimentelle Chirurgie
und pathologische Biochemie (Leitung:
Prof. Dr. med. W. Lorenz).

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Ahrens, Amon, Bernhardt, Bode, Castenholz, Dehnicke, Deppe, Dimroth, Haberich, Hensel, Hennis, Hering, Heubel, Heuser, Hort, Janke, Karlson, Koecke, Lorenz, Niemeyer, Petry, Pfütz, Remschmidt, Richter, Rohen, Rupec, Schienbein, Schiff, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schneider, Schnell, Seidel, Siefert, Spröggel, Walcher, Wehrmeyer, Wendt.

